UNIVERSITÉ DE PARIS VI
FACULTÉ DE MÉDECINE PITIÉ-SALPÊTRIÈRE

ANNÉE 1973 N°

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

MARTINE RAPHAËL-REBIÈRE
Née le 9 août 1947 à Villeneuve-Saint-Georges (Val-de-Marne)

Présentée et soutenue publiquement le

ETUDE DANS LA LEUCEMIE LYMPHOIDE CHRONIQUE DES VOLUMES LYMPHOCYTAIRES DU SANG PAR LE COULTER

Président : Professeur J.-L. BINET

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552722_0019

UNIVERSITÉ DE PARIS VI
FACULTÉ DE MÉDECINE PITIÉ-SALPÊTRIÈRE

ANNÉE 1973 N°

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

MARTINE RAPHAËL-REBIÈRE
Née le 9 août 1947 à Villeneuve-Saint-Georges (Val-de-Marne)

Présentée et soutenue publiquement le

ETUDE DANS LA LEUCEMIE LYMPHOIDE CHRONIQUE DES VOLUMES LYMPHOCYTAIRES DU SANG PAR LE COULTER

Président : Professeur J.-L. BINET

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MES PARENTS

A MON MARI

A TOUTE MA FAMILLE

A Monsieur le Professeur J.L. BINET

qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Notre Maître à qui nous devons l'enseignement de l'hématologie qui nous a guidée dans l'élaboration de notre travail.

En témoignage de notre profonde gratitude et en hommage respectueux.

A Monsieur le Docteur G. VAUGIER

qui nous a conseillée et aidée.
En témoignage de notre profonde
reconnaissance.

A Monsieur P. d'ATHIS

qui a effectué avec tant de compétence
l'analyse statistique des résultats
de notre expérimentation.

A Madame Patricia ROCHE

qui a si gentiment effectué la
dactylographie de cette thèse.
Mes sincères remerciements.

A tous les membres du Département
d'Hématologie de la Pitié-Salpétrière

qui nous ont témoigné tant de sympathie
lors de l'exécution de notre travail.

A Monsieur D. FAUDOT

A Monsieur J. ASTIER

dont la compétence et la connaissance du matériel Coulter nous ont permis d'effectuer les mesures nécessaires à notre travail.

ETUDE DANS LA LEUCEMIE LYMPHOIDE CHRONIQUE

DES VOLUMES LYMPHOCYTAIRES DU SANG PAR LE COULTER

INTRODUCTION

Il est généralement admis qu'au cours de la leucémie lymphoïde chronique existe dans le sang une augmentation des petits lymphocytes tous identiques les uns aux autres. Ce monomorphisme cellulaire s'oppose aux multiples variations évolutives de cette leucémie souvent paisible, parfois mortelle, presque toujours émaillée de complications.
Si pour établir le pronostic de la maladie on a beaucoup étudié recemment ses aspects anatomiques renouvellés par la biopsie de moelle et la lymphographie et immunologiques grace aux progrès des techniques d'exploration de l'immunité cellulaire, l'étude de la cellule elle-même, la cytologie du lymphocyte n'ont pas fait l'objet de travaux récents.

Le compteur Coulter couplé à l'analyseur multi-canaux (modèle ZBi et Channelyser C. 1000) permet de calculer le volume cellulaire, notion nouvelle qui ne peut être obtenue sur frottis. Nous avons donc soumis 25 sangs de leucémie lymphoïde chronique suivies et explorées par le département d'hématologie de la Pitié-Salpétrière (Professeur J.L.BINET) à une telle analyse. Nous étudierons successivement les tableaux cliniques de ces patients, les caractéristiques de l'appareil Coulter, le mode de préparation des prélèvements (matériel et méthodes) avant d'exposer les résultats et de discuter la valeur de cette méthode et la signification des chiffres obtenus (P. d'ATHIS).

MATERIEL et METHODES

Nous analyserons successivement les malades étudiés, l'appareil utilisé et la préparation des prélèvements.

a) Les malades

Notre étude porte sur 25 leucémies lymphoïdes chroniques avec toujours une hyperleucocytose supérieure à 10 000 globules blancs/mm3, sauf dans un cas.
Un bilan clinique, radiologique et immunologique a été entrepris pour chacun d'entre eux. Les résultats sont consignés dans le tableau 1. (voir tableau 1).

b) Matériel

1- Appareil

L'équipement utilisé a été l'ensemble Coulter constitué par les modèles ZBi, et Channelyser C 1000 (voir photo), diamètre de l'orifice 100 µ.
Principe : La détection des compteurs Coulter est basée sur le principe suivant :
On dispose d'un tube en verre plongeant dans un milieu électriquement conducteur. A la partie inférieure de ce tube est situé un micro-orifice calibré avec de part et d'autre de celui-ci une électrode de platine.
On appliquc aux bornes de celles-ci une tension continue qui provoque le passage d'un courant continu à travers la résistance équivalente constituée par l'orifice et l'électrolyte.
Les cellules à dénombrer sont mises en suspension dans le bécher et aspirées à travers l'orifice grâce à une aspiration provoquée à la partie supérieure du tube (voir schéma).
Le passage d'une cellule à travers l'orifice provoque une variation de résistance entre les électrodes directement proportionnelle au volume d'électrolyte déplacé, donc au volume de la cellule.
Il suffira de compter ces impulsions et de les différencier en amplitude pour obtenir une distribution en dimensions. Par ailleurs la longueur de ces impulsions étant de l'ordre de 10 µ sec, cette méthode

Nom	Age	lymphocytes Sg	moelle	BM	ganglions superficiels	lymphographie	rate	PAS	TTL	Electrophorèse	Traitement
LEM	76	78% 11900	90%		Actuellement 0		2 TD	Sg + 56 %	très ↘	normale	1 Chloraminophène par jour
DEL	68	98% 37400	73%	nodules	gg jugulo carotidiens bilatéraux 1 gg axillaire bilatéral 2 gg inguinaux bilat. grosses amygdales	volumineux gg lombo-aortiques D et G Rx médiastin discrète opacité latéro trachéale D	1 TD	Sg + 5 %	très ↘	normale	Chloraminophène
MAZ	62	95% 38200	69%	plusieurs nodules	0	pathologique	0	Sg ± 38 % M + 4 %	normal	normale	0
LAM	71	98% 40000	95%	diffuse	gg. inguinal rétrocrurale D jugulo carotidiens D et G axillaire G grosse amygdale G	pathologique	3 TD	M + 3 %	non fait	↘ glob ↘ IgA ↘ IgG	2 Chloraminophène par jour cure H 2 commencée le 5 mars 73
PRO	67	88% 54000			0		0		non fait		0
NAD	65	55% 4000	80%	infiltration nodulaire	poly adénopathie sous angulo maxillaires bilatérales. Ad. axil	controle non fait	0		non fait	α_2 un peu Immuno Elec. normale	2 Chloraminophène par jour arrêt en mars 73

Nom	Age	lymphocytes Sg	moelle	BM	ganglions superficiels	lymphographie	rate	PAS	TTL	Electrophorèse	Traitement
GER	77	74 % 14700	40%	nodules	0	aspect trabéculé des gg	0	Sg -	non fait	normale	2 Chloraminophène par jour
SEM	62	94% 36700			sus claviculaire G sous mentale D jugulo carotidien G inguinaux bi latéraux		2 TD		non fait	ϒglob↘	3 chloraminophène par jour
DEH	53	90 % 30200	52%	diffuse	0	normale	0	M + 1 % Sg + 25 %	un peu ↘	normale	0
MOR	76	90 % 25200	81,5 %		gg sus claviculaires D et G jugulo carotidiens D et G		0		non fait	ϒglob↗	0
THO	75	80 % 27000		infiltration nodulaire diffuse	0	↗ discrète des ϒϒ controle illisible	pointe		↘	normale	0
AND	60	92 % 15400	20 %	normale	0	normale	0	Sg + 36 % M + 18 %	↘	ϒ glob↗ légère↗ des IgG	0

Nom	Age	lymphocytes Sg	moelle	BM	ganglions superficiels	lymphographie	rate	PAS	TTL	Electrophorèse	Traitement
BAN	71	77 % 20400	65 %	diffuse	0	hyperplasie diffuse des lombo Ao	2 TD	Sg + 25 % M + 51 %	test -	↗glob↘	0
GOL	64	90 % 19800	67,5%	plusieurs nodules	sus claviculaires D et G jugulo carotidien G sous angulo maxillaire G	pathologique	0	Sg + 2 % M + 3 %	↘	normale	0
VES	78	99 % 124000	60%	infiltration diffuse	jugulo carotidiens D et G inguinaux D et G axillaires D et G	pathologique	0	Sg + 35 %	non fait	normale	3 Chloraminophène par jour
BER	66	92 % 43000	41%		0	normale médiastin normal	1 TD	Sg - M + 4 %	non fait	normale	0
CUS	50	94 % 19300	39 %	nappes lymphocytaires nal limitées	gg inguinaux bilatéraux . grosses amygdales	illisible	0	Sg + 0,5 %	normal	IgM ↘ IgA ↘	0
CAR	63	92 % 35000	30 %	nodules	0 élément cutané spécifique face ant. épaule D	normale	2 TD	M + 2 %	↘	normale	3 Chloraminophène par jour

Nom	Age	lymphocytes Sg	moelle	BM	ganglions superficiels	lymphographie	rate	PAS	TTL	Electrophorèse	Traitement
DEN	75	97 % 64000	59 %	infiltration diffuse	0	normale	0	Sg + 4 % M + 47 %	très ↘	IgM ↘ IgA ↘	0
LOB	64	96 % 180000	91,5 %		1 gg axillaire D	pathologique	0	Sg + 13 % M + 60 %	non fait		0
RUB	50	97 % 24000			petits gg jugulo carotidiens bilatéraux, sous angulo maxillaires	volumineux gg bilatéraux symétriques	1 TD	Sg + 61 %	↘	normale	3 Chloraminophène par jour
CAN	63	78 % 22600	61,5 %	lymphocytes disperses	gg inguinaux bilatéraux	grosses adénopathies		Sg + 2 % M + 2 %	peu ↘	normale	0
CAM	69	98 % 50000	45 %	infiltration diffuse	actuellement 0 grosse amygdale G	très gros gg profonds	2 à 3 TD	Sg + 11 % M + 2 %	↘	normale	0
BRE	59	93% 38400	63,5%		0		0	Sg + 1 % M -	↘		0

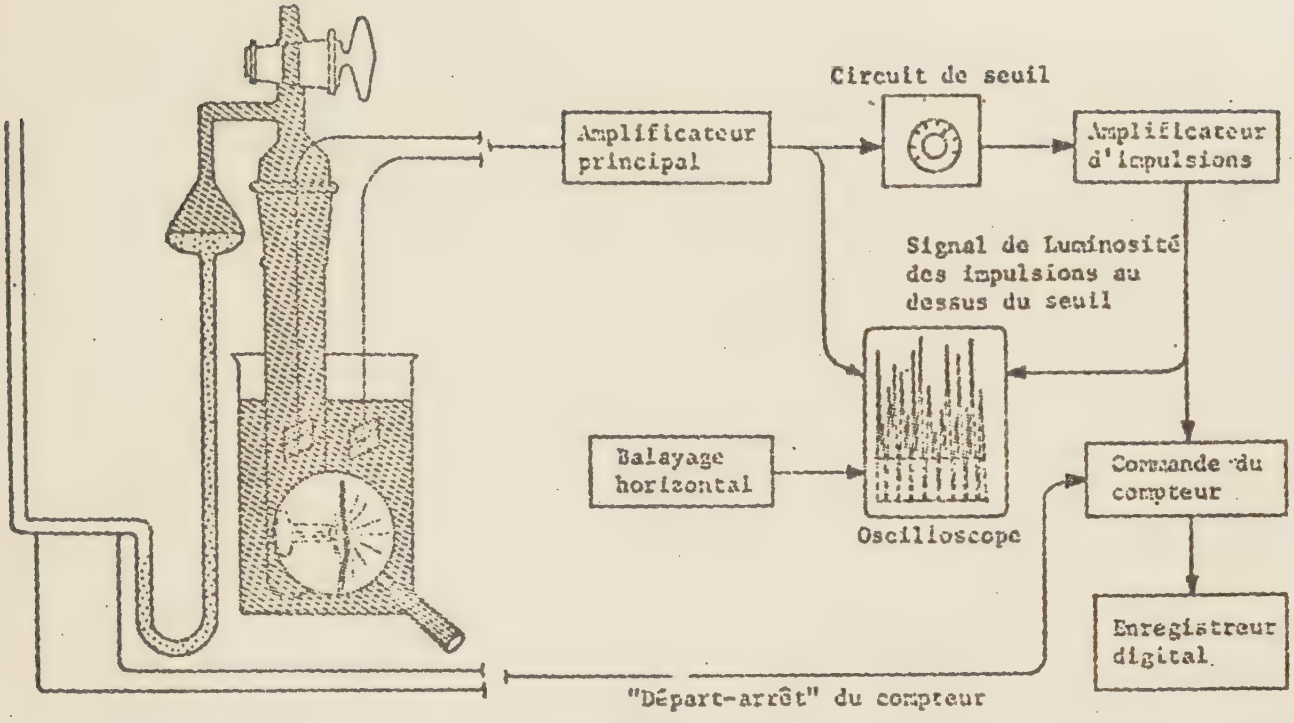
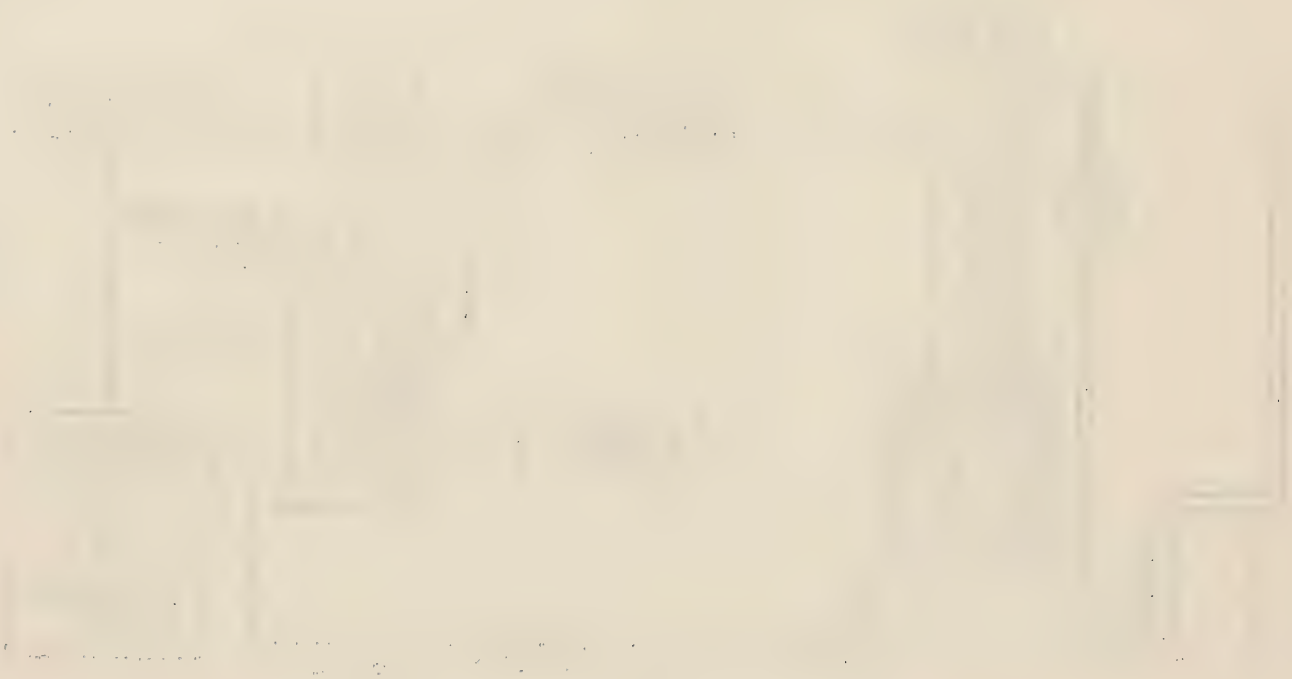


Fig. 2.

Schéma du principe Coulter



sera à la fois linéaire en volume, mais aussi très représentative en nombre d'éléments enregistrés.

Distribution en dimensions :

Modèle ZBi :

Pour effectuer celle-ci il est nécessaire de différencier l'amplitude des impulsions provoquées, par le passage des cellules. A cette fin le modèle ZBi dispose de trois paramètres de sensibilité : l'amplification, l'intensité du courant et un discriminateur d'amplitude. Tous les trois sont directement linéaires en volume, les deux premiers entrainent une variation de sensibilité dans un rapport de 2 ou V 2 suivant les positions, le troisième est un paramètre de précision. En réalité la somme de ces trois variables permet des différenciations de volume dans un rapport de 1 à 30 000.

Dans la zone d'action du discriminateur d'amplitude (t'), c'est à dire de 1 à 100, les impulsions sont visualisées sous forme de batonnets sur un oscilloscope. C'est dans cette zone que les impulsions peuvent être comptées et différenciées, aussi le courant d'ouverture (I) et l'amplification (A) seront utilisés afin de venir placer l'équipement dans les conditions optimum de sensibilité vis à vis de l'échantillon à analyser.

Le modèle ZBi étant un appareil à comptages séquentiels en nombres cumulés ou différenciels, il sera possible de procéder à l'analyse en effectuant des comptages point par point.

Afin de transformer en dimensions (diamètre ou volume), les réglages effectués on procédera à l'étalonnage.

Celui-ci consistera à rechercher les réglages correspondant à l'amplitude moyenne provoquée par le passage de particules mono-dimensionnelles (engendrant des impulsions de hauteur uniforme).

les coefficients d'étalonnage K_v et K_d , respectivement en volume et en diamètre seront égaux au rapport de la dimension de l'étalon (d) sur la sensibilité de l'équipement :

$$K_v = \frac{\frac{\pi}{6} d^3}{t'.I.A} \qquad \text{et } K_d = \frac{d}{\sqrt{t'.I.A}}$$

si I et A restent constants :

$$K_v = \frac{\frac{\pi}{6} \; d^3}{t'}$$

Dans ce cas toutes valeurs de l'échelle du discriminateur d'amplitude est directement transposable en $\mu 3$: $V = K_v \; t'$

Channelyser C. 1000

Le Channelyser est un analyseur en 100 canaux permettant une automatisation totale de l'analyse en dimensions des cellules. Il remplace l'action manuelle du discriminateur (t') du modèle ZBi.
Deux paramètres permettent de positionner ces 100 canaux en fonction du type de l'analyse désirée, soit une cuve d'ensemble de la distribution totale, soit une différentiation très fine dans une zone particulièrement intéressante. Le premier est un réglage de seuil inférieur, le second est la largeur de la fenêtre d'action des 100 canaux. Dans ce cas la dimension correspondant à un canal sera :

$$V_{\mu 3} = K_v \left(\text{seuil inférieur} + \left(\frac{\text{largeur - fenêtre}}{100} \times \text{canal}\right)\right)$$

par exemple : - seuil inférieur = 10
- largeur de la fenêtre = 90

la dimension du canal 40 sera :

$$V_{\mu 3} = K_v \left(10 + \frac{90}{100} \times 40\right)$$

Le tracé de la distribution est visualisé sur un oscilloscope et envoyé automatiquement sur un enregistreur XY.

Grâce à cinq indicateurs numériques, il est possible de connaitre le nombre réel de cellules comptées canal par canal ou dans un groupe de canaux. Ceci est visuellement facilité par un ou deux points lumineux se déplaçant sur la courbe, soit sur le canal interrogé, soit sur les canaux extrèmes.

Enfin l'échantillonnage peut être effectué de trois manières différentes :

- à l'aide du manomètre à mercure du modèle ZBi permettant une prise de suspension de volume connu,

- au travers d'une préselection du temps durant lequel le comptage est effectué,

- une préselection du nombre de cellules comptées dans le canal correspondant au maximum de la population.

C'est cette dernière solution que nous avons choisie, car elle permet, en automatique, des déploiements de courbes comparables. En effet nous avons préselectionné une valeur de 1000 cellules pour le canal le plus riche, et nous avons réglé le déploiement de l'échelle des X de l'enregistreur pour cette valeur.

2- Préparation des lymphocytes

Le sang prélevé par ponction veineuse est recueilli sur Calciparine. Il est laissé sédimenté pendant une heure à 37°, chaque tube étant incliné à 45°.

Le plasma contenant les leucocytes est prelevé par pipettes Pasteur. Il contient des globules rouges, des lymphocytes et des polynucléaires, les globules rouges ayant un spectre volumétrique très différent des leucocytes seront facilement différenciés par le Coulter. Par contre les lymphocytes et les polynucléaires sont plus difficiles à séparer, et avant de passer les prélèvements au Coulter, nous avons déterminé sur frottis après coloration au May Grunwald Giemsa les proportions respectives des différentes cellules (tableau 2 bis). Comme on le voit les lymphocytes constituent la majorité des cellules étudiées, mais on peut classer ces prélèvements en deux fractions : ceux où il y a moins de 10 % (2) et ceux où il y a plus de 10 % de polynucléaires.(3)
Avant de passer ces cellules au Coulter, les prélèvements sont divisés en deux lots, l'un laissé sans préparation et conservé à + 4° pendant 36 heures, l'autre fixé à la glutaraldehyde diluée à 2 % dans le tampon phosphate 0,1M pendant une demi-heure et remis en suspension dans le tampon phosphate.

3- Fixation pour la microscopie électronique

Ces derniers prélèvements, après avoir été comptés sont fixés par l'acide osmique deshydratée et inclus pour la microscopie élec-

Noms	N°	Pourcentage poly < 10 %
CAM	1	2 %
RUB	2	3 %
LOB	3	4 %
DEN	4	3 %
MAZ	5	5 %
LAM	6	2 %
SEM	7	6 %
BER	8	8 %
DEL	9	2 %
GOL	10	10 %
AND	11	8 %
VES	12	1 %
MOR	13	10 %
CUS	14	6 %
DEH	15	10 %
BRE	16	8 %
CAR	17	3 %

tableau 2

Echantillons de sang de leucémie lymphoïde chronique avec moins de 10 % de polynucléaires.

Noms	n°	Pourcentage poly > 10 %
BAN	18	23 %
THO	19	23 %
CAN	20	20 %
GER	21	26 %
LEM	22	22 %
PRO	23	12 %
COR	24	17 %
NAD	25	11 %

tableau 3

Echantillons de sang de leucémie lymphoïde chronique avec plus de 10 % de polynucléaires.

tronique. L'analyse stéréologique de ces cellules fait l'objet d'un travail en cours.

RESULTATS

Pour chaque patient le Coulter a permis d'obtenir un histogramme sur des cellules non fixées et fixées. Chaque histogramme comprend 100 classes (100 canaux) avec pour chaque classe un effectif maximum de 1 000 cellules (1 000 points).

1) Comparaison des spectres avant et après fixation

L'absence de fixation laisse persister seulement les lymphocytes. Polynucléaires et lymphocytes plus jeunes ont disparu. Dans cette population de lymphocytes laissés 36 heures à +4° l'état des cellules est variable.

Les prélèvements après fixation comportent un mélange de lymphocytes, de polynucléaires et peut être de lymphocytes plus jeunes. L'état des cellules reste bon et a été controlé au microscope électronique.

La comparaison des spectres des deux préparations chez 9 patients a montré les faits suivants : a) dans les prélèvements fixés, déplacement du pic des volumes vers la droite, b) dans les mêmes prélèvements persistance du premier pic lymphocytaire d'une autre population correspondant aux polynucléaires et peut être aux plus grands lymphocytes.

Le spectre obtenu sans fixation représente donc une seule population lymphocytaire, malheureusement l'état des cellules rend difficile l'interprétation des chiffres obtenus.

2) Résultats sur les prélèvements de lymphocytes fixés comportant moins de 10 % de polynucléaires (figures 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12)

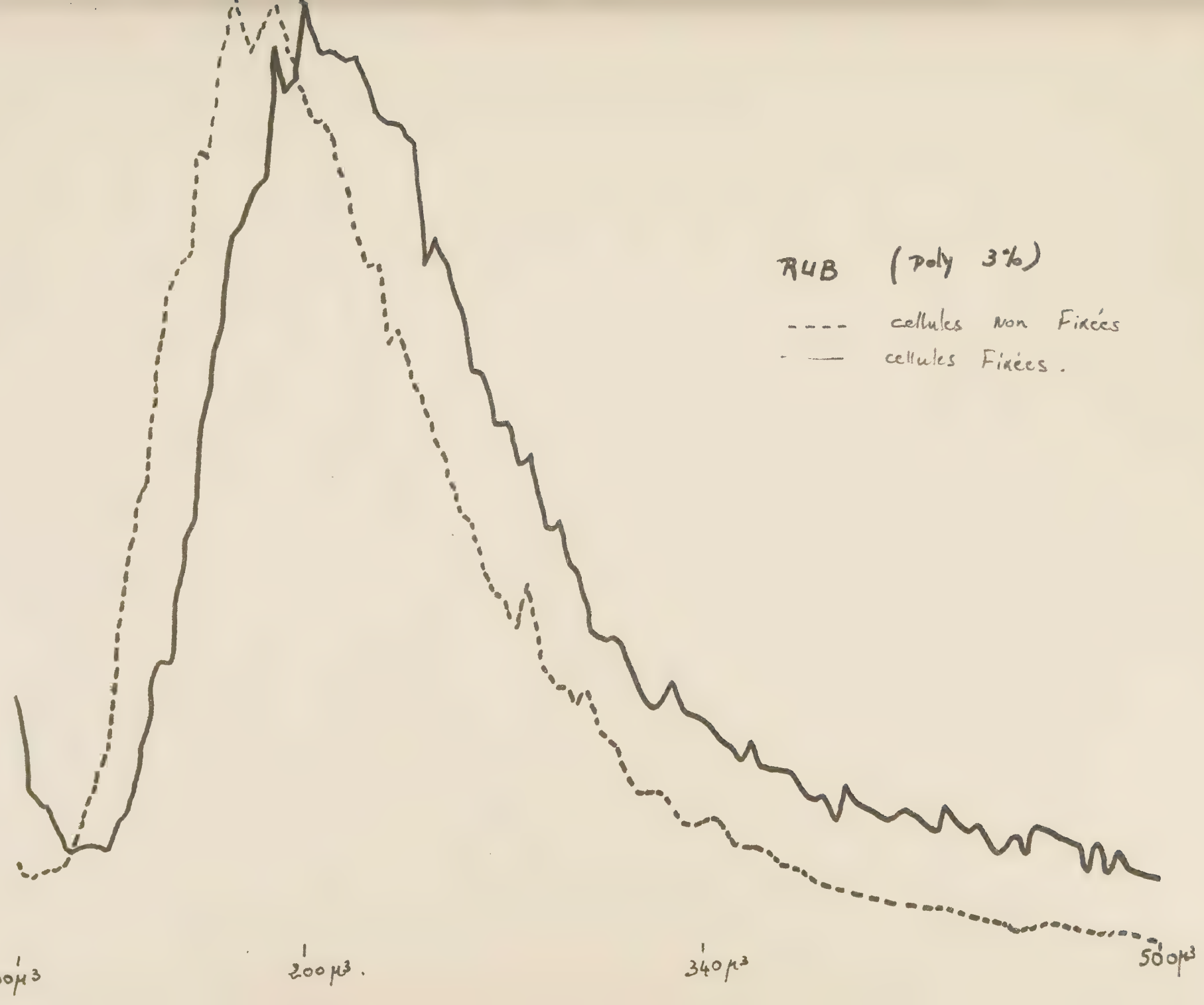
Pour cette raison nous n'avons calculé la moyenne des volumes que sur les prélèvements fixés par la glutaraldehyde et qui comportaient moins de 10 % de polynucléaires, et après avoir éliminé statistiquement les polynucléaires d'après les volumes connus dans la littérature (420 $\mu 3$ de moyenne).

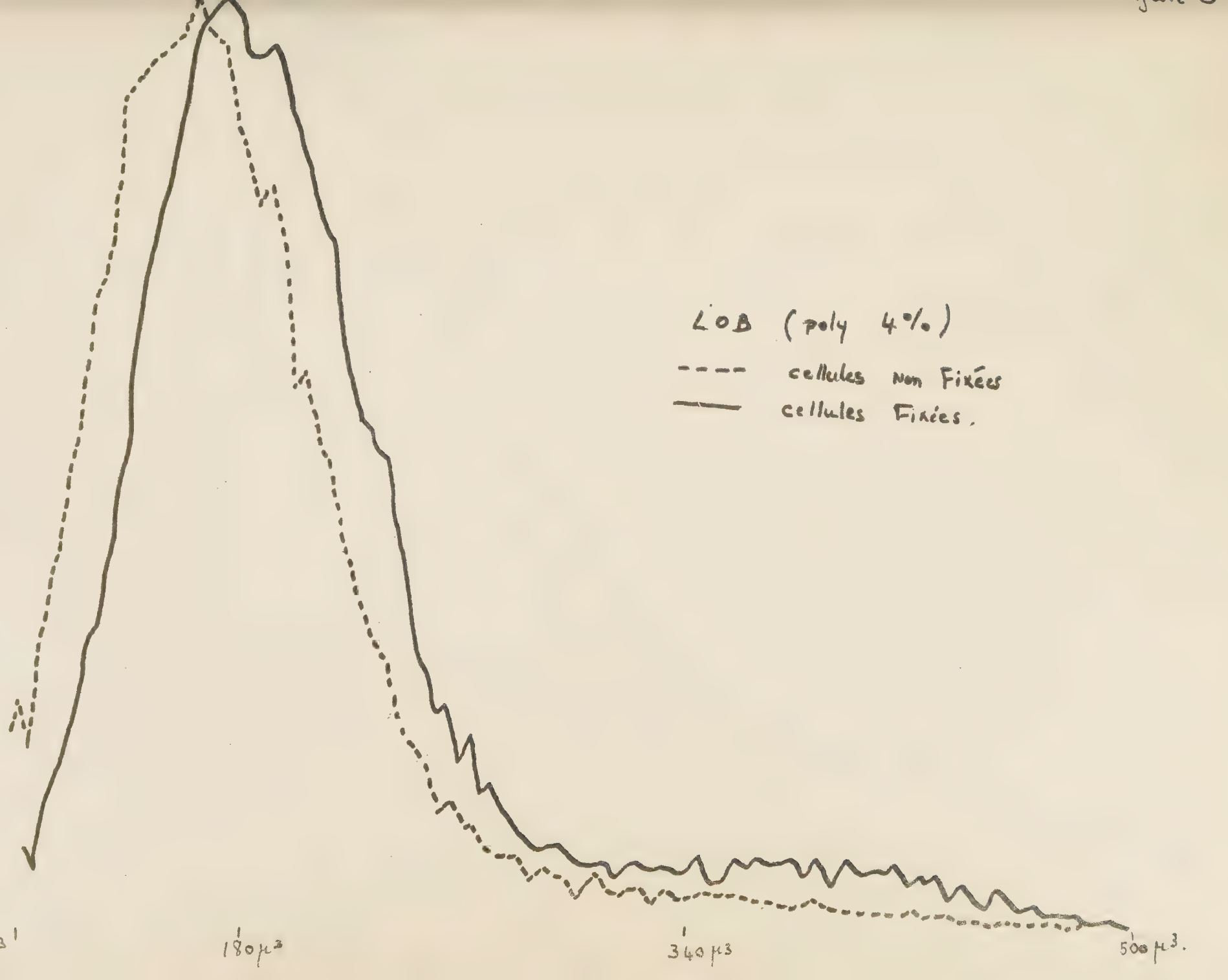
La moyenne des volumes (tableau 4) permet de distinguer deux groupes de patients : a) les uns (malades 1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,13) ont un volume autour de 240 $\mu 3$, b) les autres (malades 3,12) ont un volume beaucoup plus bas et ces lymphocytes sont certainement differents car l'écart type observé est assez étroit. Reste à savoir s'il existe entre les polynucléaires et les petits lymphocytes ainsi mesurés une deuxième population de lymphocytes plus volumineux. Elle peut être

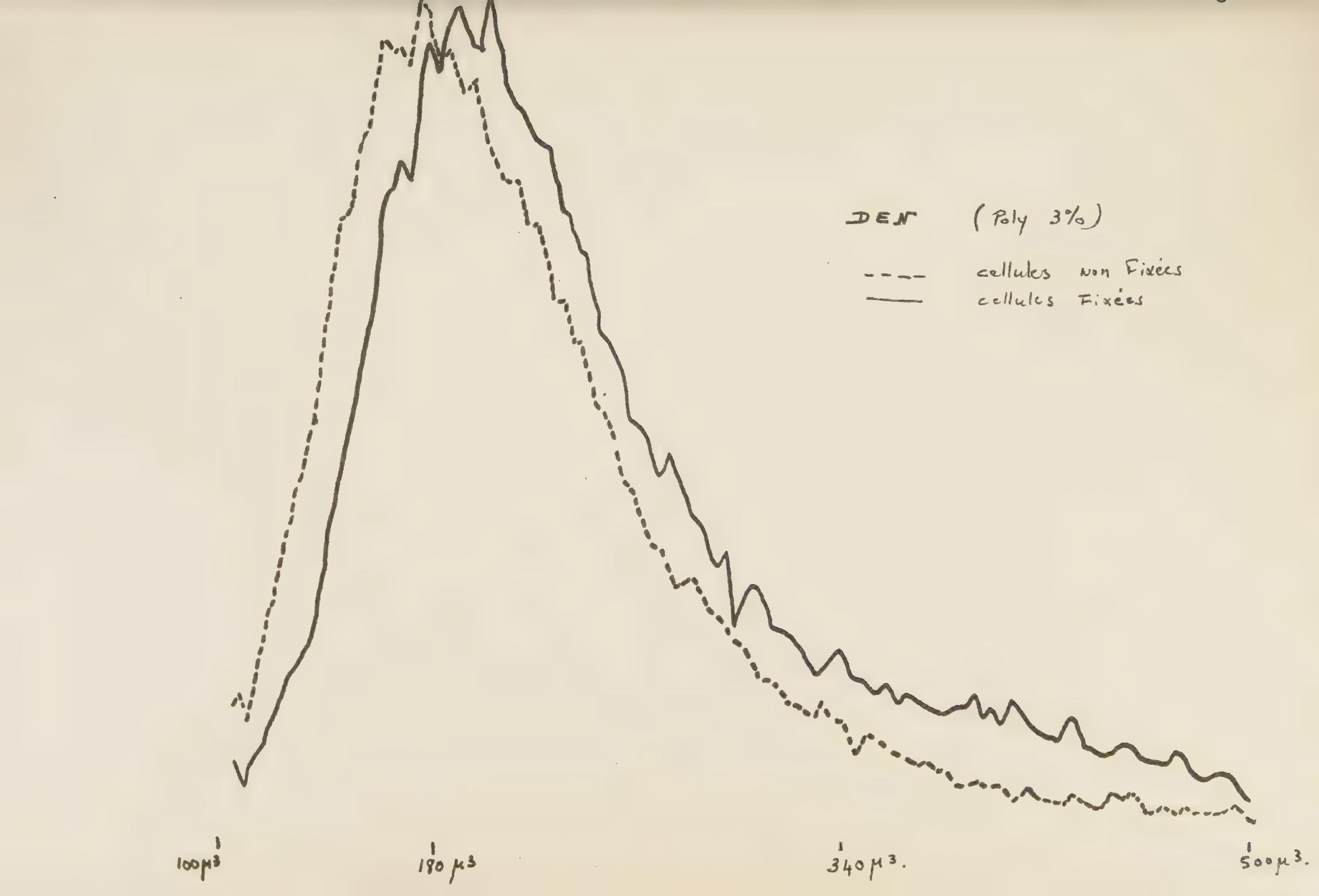
Noms	n°	volume moyen (u3)	écart type (u3)
CAM	1	250	40
RUB	2	234	65
LOB	3	183	23
DEN	4	220	65
MAZ	5	232	67
LAM	6	265	80
SEM	7	254	80
BER	8	210	72
DEL	9	260	65
GOL	10	272	100
AND	11	246	60
VES	12	186	62
MOR	13	250	52
CUS	14	230	67
NAD	15	284	87

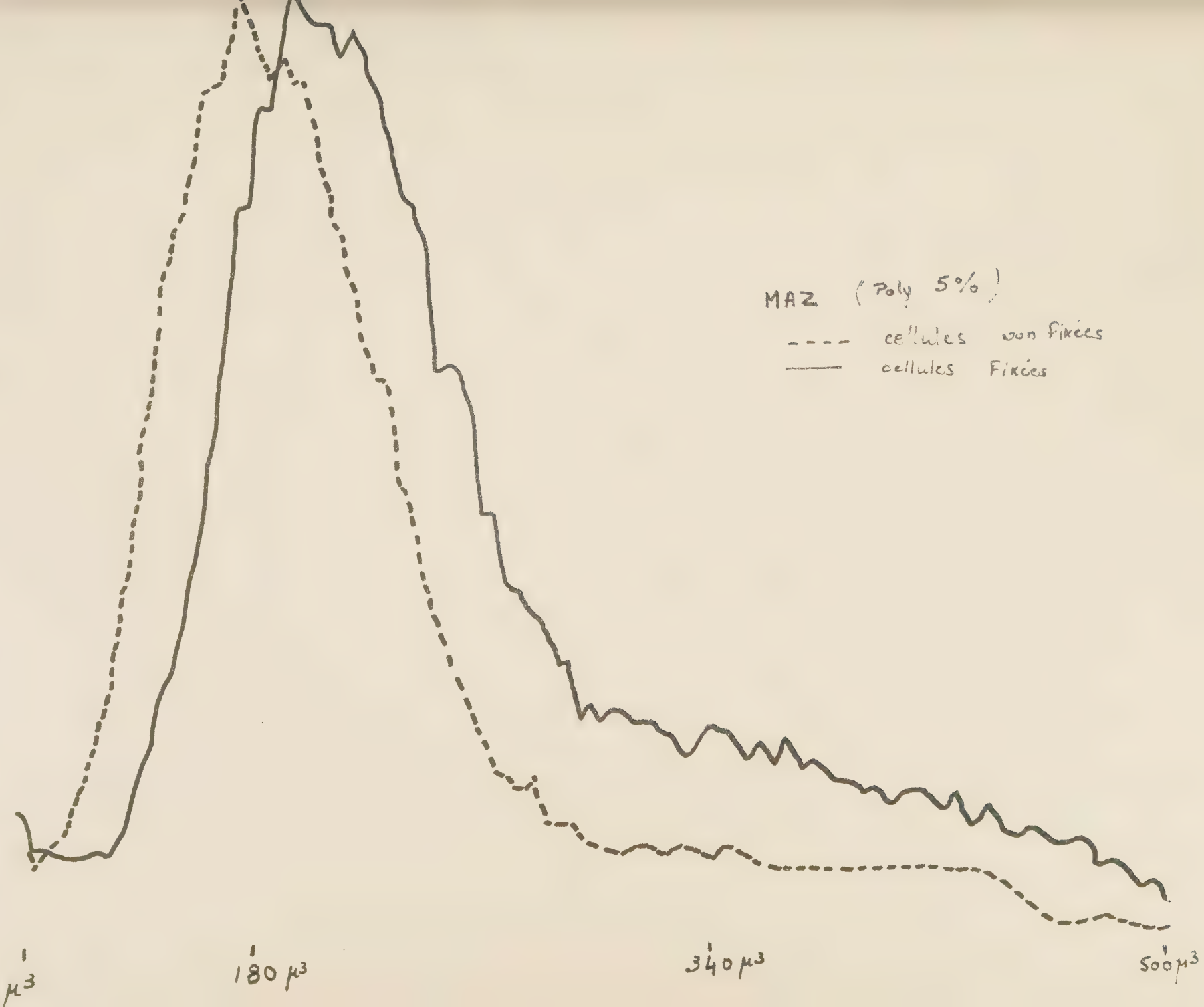
tableau 4

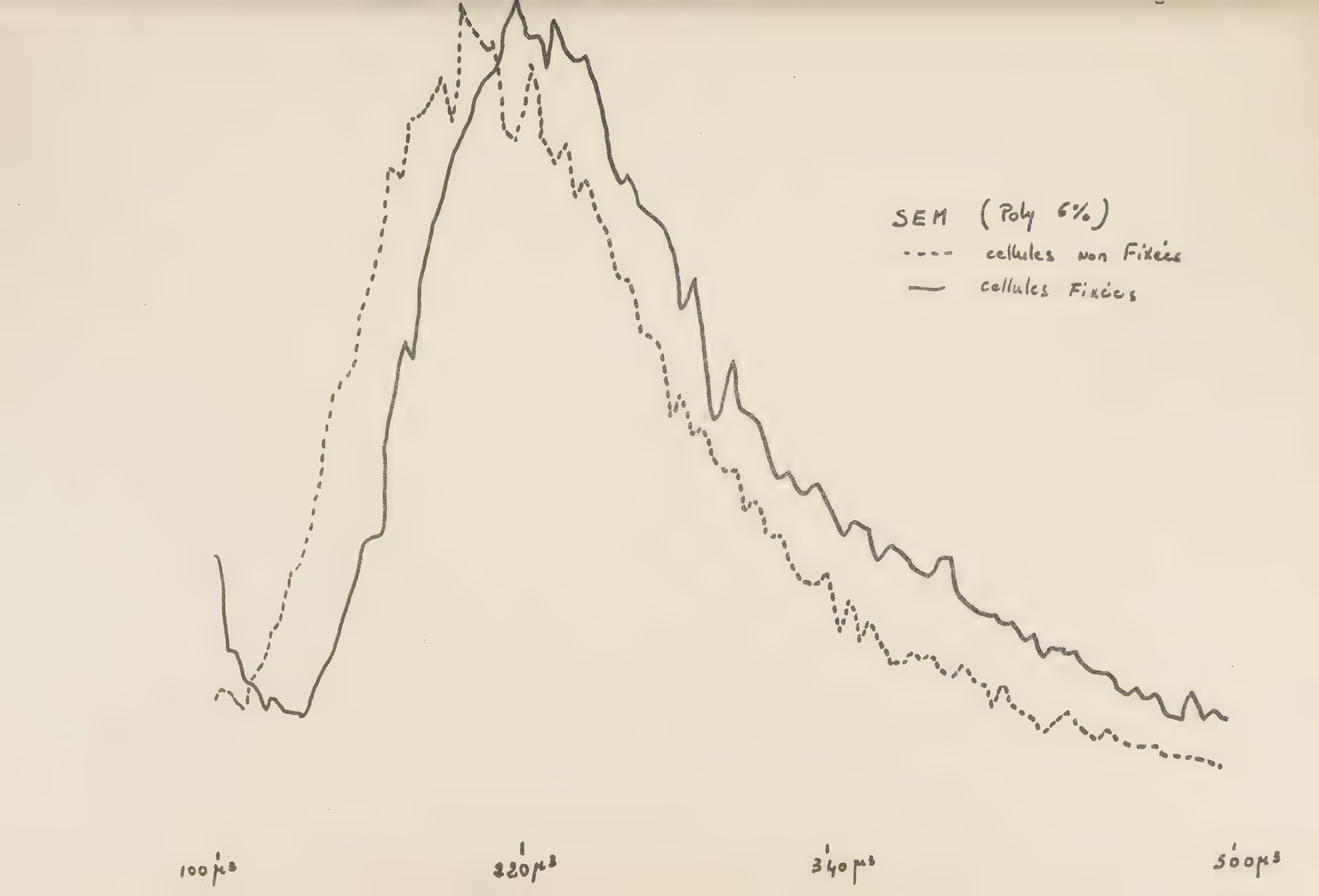
Volumes moyens et écarts types


RUB (poly 3%)
---- cellules non Fixées
—— cellules Fixées.
100 µ3
200 µ3.
340 µ3
500 µ3


LOB (poly 4%)
---- cellules non Fixées
—— cellules Fixées.
100µ3
180µ3
340µ3
500µ3.

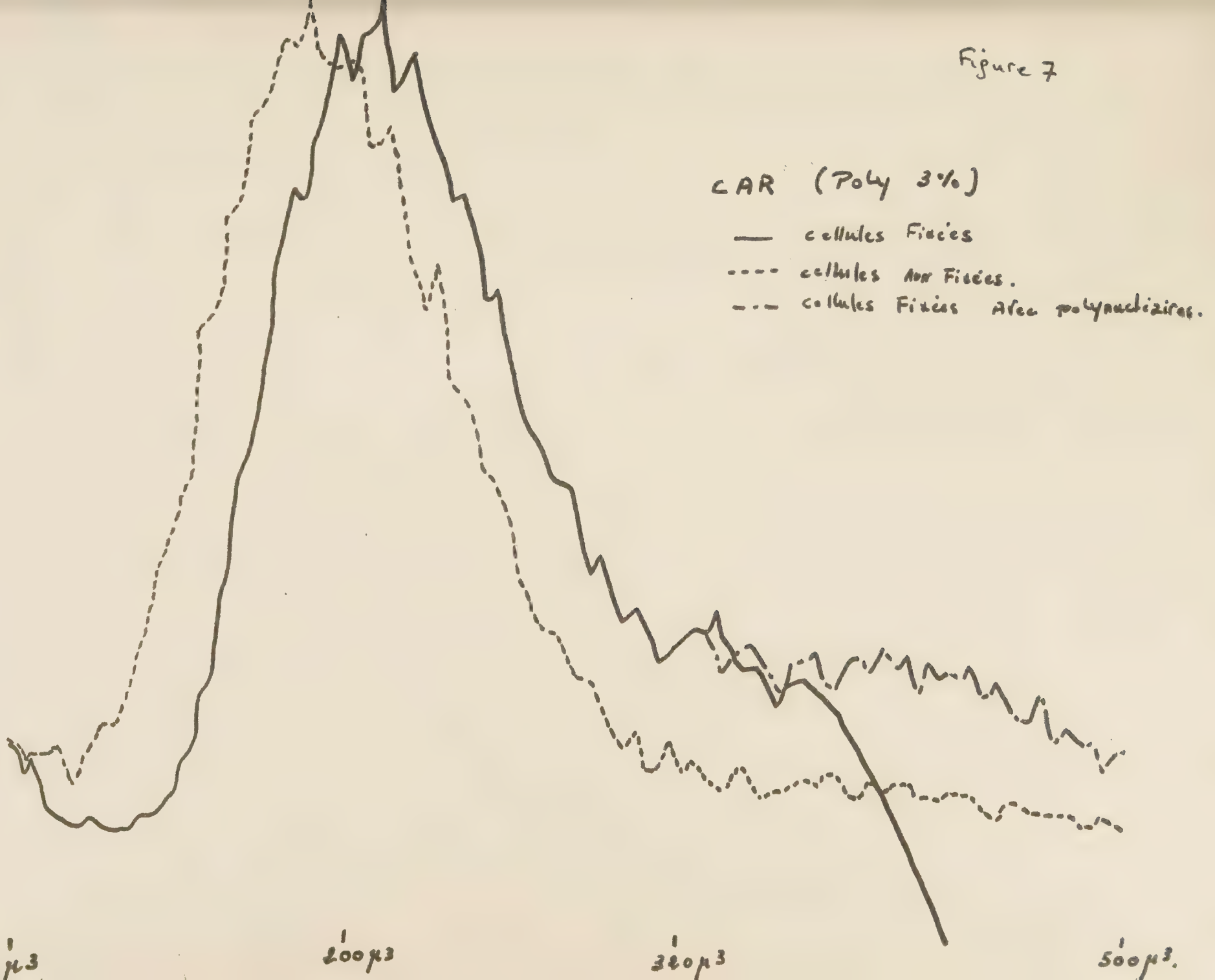

DEN (Poly 3%)
cellules non Fixées
cellules Fixées
1/100 µ3
1/180 µ3
1/340 µ3.
1/500 µ3.

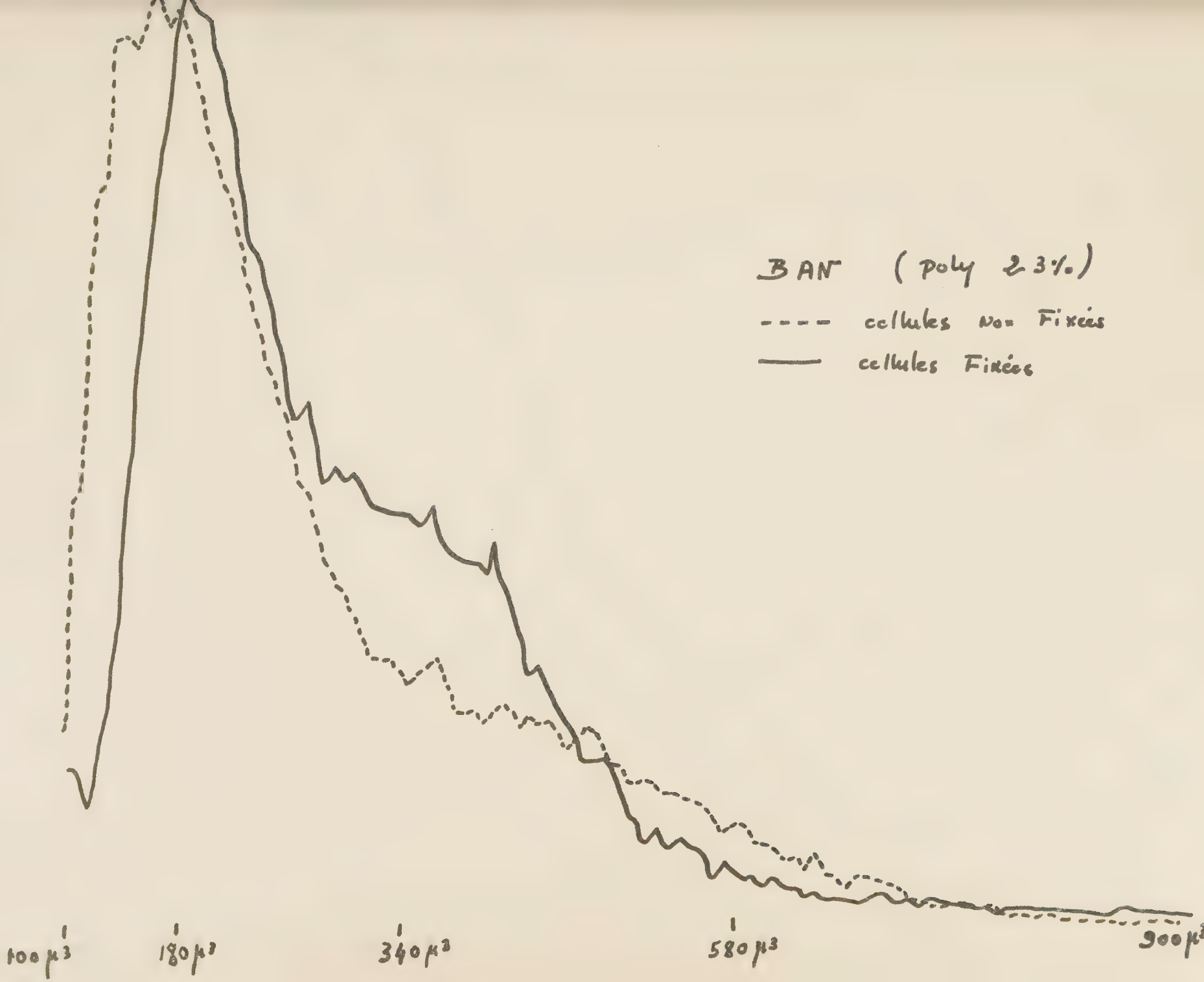

MAZ (Poly 5%)
---- cellules non fixées
—— cellules Fixées
100 µ3
180 µ3
340 µ3
500 µ3

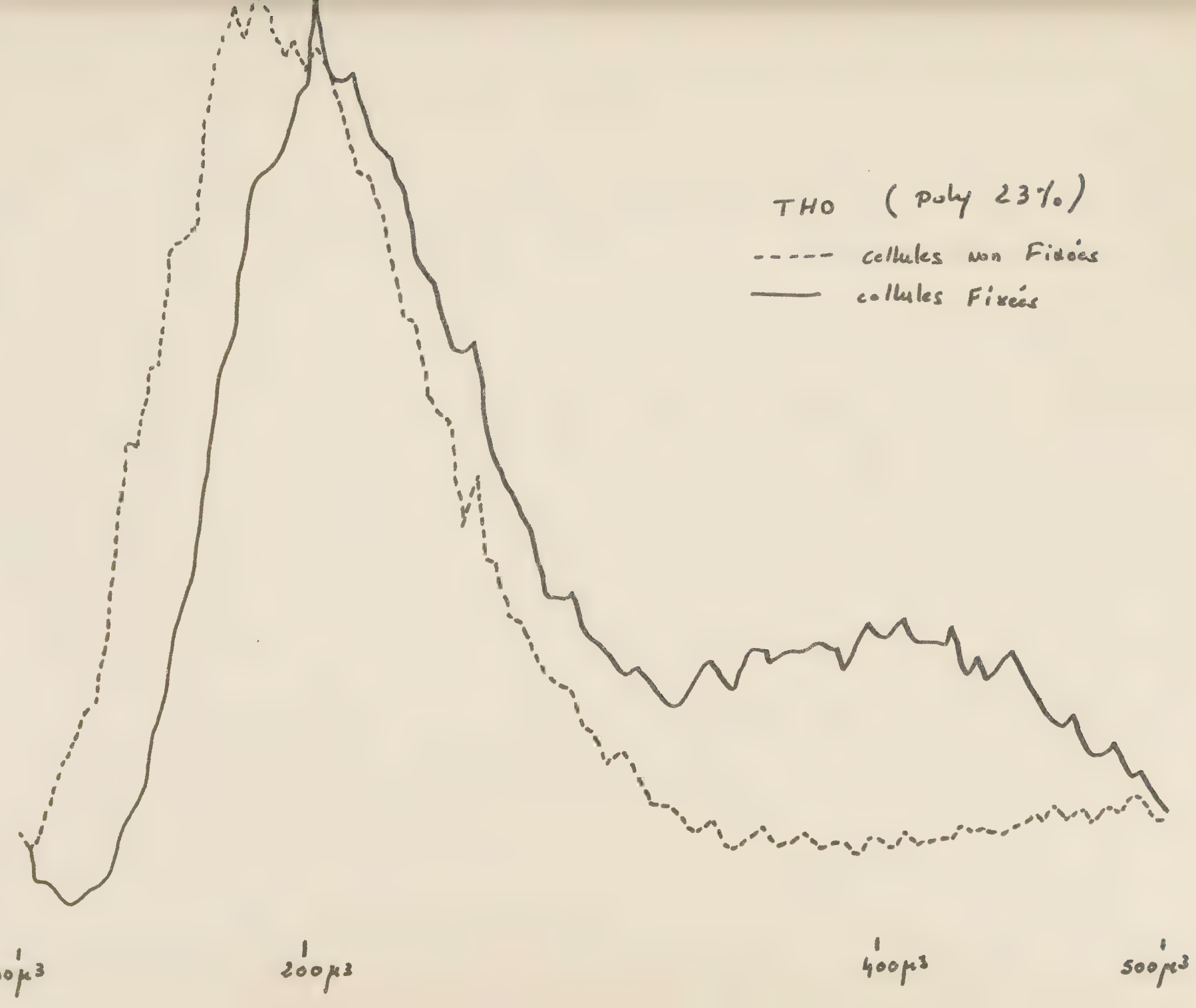

SEM (Poly 6%)
---- cellules non Fixées
— cellules Fixées
100 µs
220 µs
340 µs
500 µs

DER (poly 8%)
cellules non Fixées
cellules fixées
50 µm3
170 µm3
310 µm3
450 µm3

Figure 7

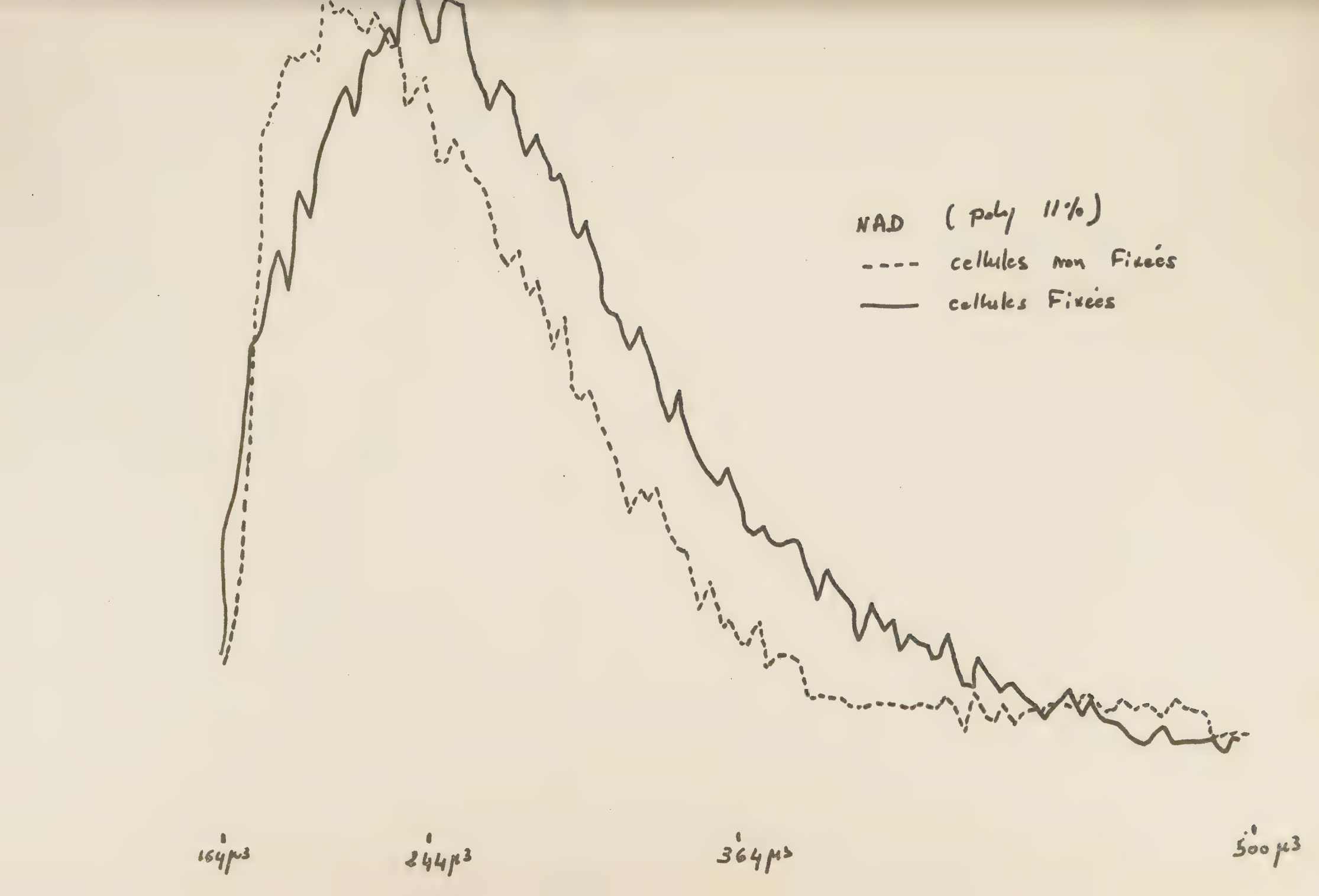

CAR (Poly 3%)
cellules Fixées
cellules non Fixées.
cellules Fixées avec polynucléaires.
80 µ3
200 µ3
320 µ3
500 µ3.


BAN (poly 2 3%)
---- cellules non Fixées
—— cellules Fixées
100 µ³
180 µ³
340 µ³
580 µ³
900 µ³


THO (poly 23%)
----- cellules non Fixées
——— cellules Fixées
100 µ3
200 µ3
400 µ3
500 µ3

GER. (Poly 26%)
---- cellules Non Fixées
—— cellules Fixées
100 µ3
200 µ3
340 µ3
420 µ3
500 µ3

L.E.M. (poly 28 %)
---- cellules non Fixées
—— cellules Fixées
130 µ3
210 µ3
390 µ3
530 µ3


NAD (poly 11%)
---- cellules non Fixées
—— cellules Fixées
164 µ3
244 µ3
364 µ3
500 µ3

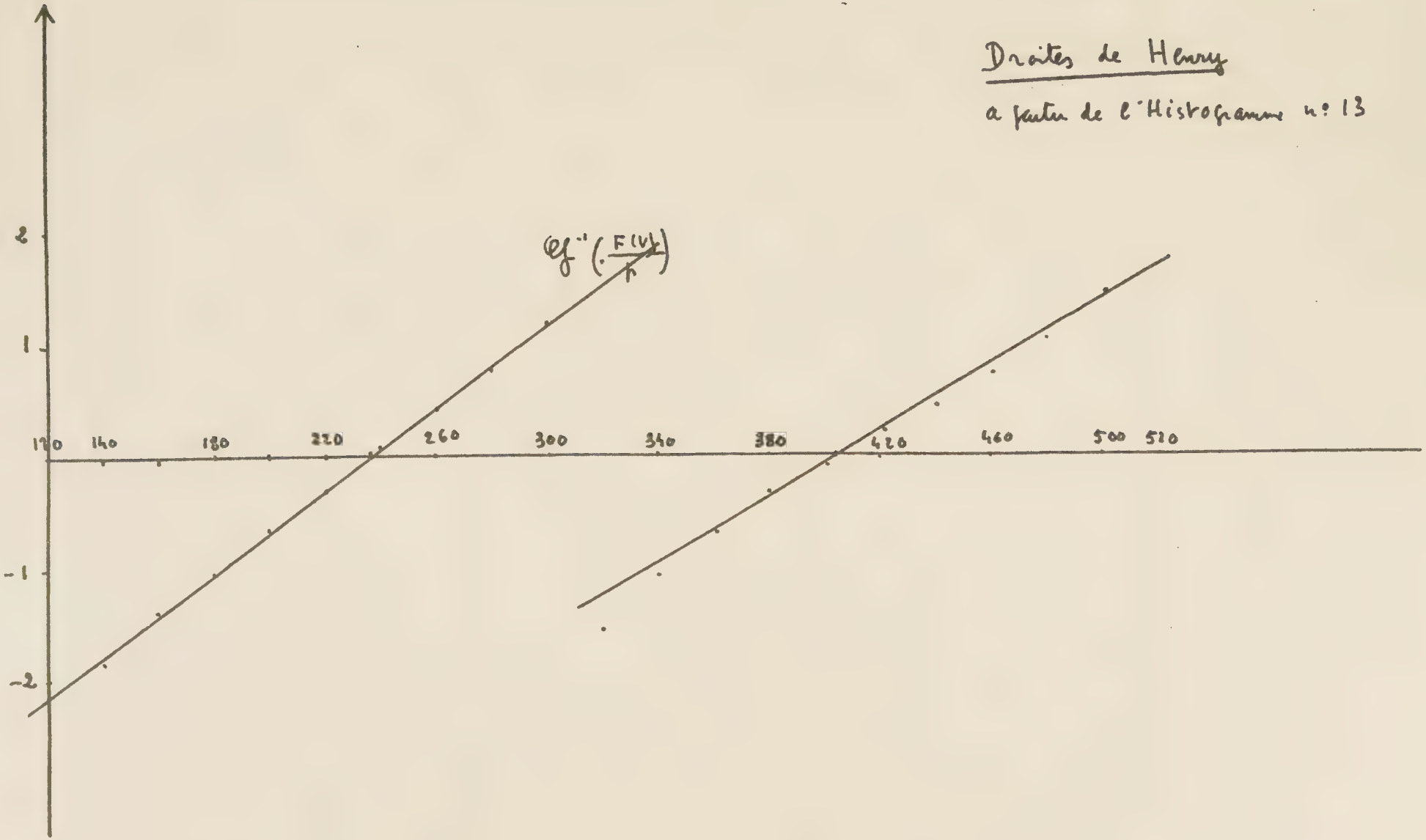
Tho { Pdlyp 20%
Lymphos 80%
244 μ³

$f_1 = .8$ $f_2 = .2$

$m_1 = 240\,\mu^3$ $m_2 = 400\,\mu^3$

Droites de Henry

à partir de l'Histogramme n° 13



statistiquement éliminée chez tous ces patients, par contre chez trois malades (BRE, CAR, DEH), après avoir éliminé statistiquement la population des polynucléaires, persiste un autre pic correspondant à des volumes plus grands. Seule la corrélation sur les images des mêmes prélèvements fixés au microscope électronique et analysés stéréologiquement permettra de conclure.

3) Analyse de l'histogramme par la méthode des droites de HENRY

A partir d'un prélèvement sanguin d'une leucémie lymphoïde chronique déjà étudiée sur le graphique 9 (THO), nous avons : a) séparé les polynucléaires par la méthode de la laine de verre, b) obtenu un mélange de lymphocytes (80 %) et de polynucléaires (20 %) et c) passé ce mélange au Coulter (figure 13).

Reprenant la technique déjà utilisée par SIPE (16), nous avons utilisé la méthode des droites de HENRY pour analyser les diverses populations volumétriques. A partir de 20 points de la courbe séparés chacun de 10 $\mu 3$ le diagramme est transformé en une courbe cumulative. S'il existe deux populations, leur fonction de répartition répond à la formule suivante :

$$F(V) = p \cdot \varphi\left(\frac{V - V1}{\sigma 1}\right) - (1 - p)\,\varphi\left(\frac{V - V2}{\sigma 2}\right)$$

V1 = volume de la plus petite population
1 = son écart type
V2 = volume de la seconde population
2 = son écart type

Si on prend V très proche de V1, la deuxième partie de la formule est égale à 0, et

$$F(V) \neq p \cdot \varphi\left(\frac{V - V1}{\sigma 1}\right)$$

On peut tracer ainsi la droite 1 qui correspond à 80 % de la population avec une moyenne de 240 $\mu 3$.

Si on choisit V très proche de V2 on reconstitue la droite de la deuxième population avec une moyenne de 400 $\mu 3$ qui correspond à 20 % des cellules (figure 14).

La méthode des droites de HENRY a donc permis de reconstituer le volume moyen et la quantité des deux populations : celle des lymphocytes et celle des polynucléaires.

DISCUSSION

La détermination des volumes cellulaires par le Coulter est une acquisition récente. Nous étudierons comment l'appareil permet de l'obtenir pour discuter ensuite ce qu'elle peut apporter à l'étude des lymphocytes de la leucémie lymphoïde chronique.

Valeur de la technique

a) Principe

Sur frottis, seuls les diamètres des cellules artificiellement étalées sur le verre pouvaient être mesurés. Le volume, le "volume globulaire moyen" n'était obtenu que par le calcul du rapport de l'hématocrite sur la numération, mais cette moyenne, cette seule moyenne reste inaccessible aux autres cellules du sang.

Les compteurs électroniques de particules ont d'abord permis de calculer les volumes reels des cellules dans le liquide de dilution. Compteur à un seul seuil (Coulter F) ils déterminent le nombre de cellules ayant un volume supérieur au seuil; Compteurs à deux seuils (Coulter modèle B) ils ont introduit les caractéristiques de distribution de la population et à la moyenne ont ajouté la notion d'écart type de variance . La mesure de chaque classe volumétrique permet de lentement tracer l'histogramme de distribution. Coulter à 100 canaux (Channelyser C. 1000) avec pour chaque canal mesure de 1000 cellules; le "spectre" est tracé graphiquement en quelques secondes.

b) Applications hématologiques

Très précis dans ses déterminations volumétriques, le compteur ne voit pas l'objet compté. Il ne permet pas de différencier deux types de cellules de même volume. Il fut donc d'abord surtout utilisé pour analyser plusieurs populations volumétriques dans un même type cellulaire.

Dans la lignée rouge BRECHER[12], LUSHBAUGH[13], INGRAM[7], LE GO[12] ont différencié dans le spectre obtenu deux populations ayant chacune une distribution normale : la plus grande correspondant aux réticulocytes et globules rouges jeunes, la plus petite aux globules rouges plus murs. Les modifications dans divers espèces ou chez l'homme après hémolyse et irradia-

tion ont été très étudiées . (2.3.7.11.12).
Dans la lignée plaquettaire deux types de cellules ont été individualisées, et cette dualité a été retrouvée par les techniques de gradient (10)
L' étude des populations de globules blancs dans le sang total par analyse des spectres n'a pas donné de bons résultats. La proportion des rouges est si importante qu'ils doivent être supprimés mais l'hémolyse par la saponine modifie les volumes leucocytaires. VAN DILLA (19) a pu concentrer les globules blancs et obtenir 4 fractions : la première, de globules rouges, la seconde, de petits lymphocytes, les deux autres, un mélange de granulocytes, de monocytes et de grands lymphocytes. H. LEE (8) a étudié par la même technique les cellules de la moëlle mais se heurte aux mêmes problèmes.

c) Lymphocytes normaux

L'analyse des lymphocytes par le Coulter à particules suppose donc d'abord une séparation des cellules car leurs volumes interferent avec celui des granuleux.
Dans le canal thoracique (16) ou il existe ni rouges ni granuleux, SIPE et coll. ont étudié chez huit veaux les différents volumes lymphocytaires.
Alors que cytologiquement il semblait exister lymphoblastes, grands, moyens et petits lymphocytes, l'étude des spectres a permis de tracer un histogramme dont le groupe de distribution cumulative sépare les populations en deux catégories : celle faite de petits lymphocytes avec comme moyenne 250μ3 (variant de 142 à 425) et celle faite de cellules plus grandes de 648μ 3 de moyenne (variant de 370 à 1150).
Dans les vaisseaux lymphatiques efferents SCHNAPPAUF (15) a retrouvé des distributions identiques et montré qu'elles se modifiaient après immunisation : augmentation de la proportion des plus grandes cellules qui disparaît d'ailleurs assez rapidement.
Par gradient et densité en sérum albumine, ZUCKER et CASSEN (20) ont séparé les lymphocytes du sang humain en huit fractions, et ont retrouvé des variations de volume assez semblables à celles décrites par CRONKITE (entre 191 et 264μ 3).

d) Lymphocytes de la leucémie lymphoïde chronique

Nous n'avons pas trouvé de référence sur de tels travaux dans

la leucémie lymphoïde chronique.

A cause du recouvrement entre volume des granuleux et volume lymphocytaire, les résultats obtenus chez les malades avec plus de 20 % de lymphocytes (tableau 3) ne seront pas rendus, et nous ne tiendrons compte dans cette discussion que de ceux avec moins de 10 % (tableau 2).

L'étude des moyennes permet de séparer deux patients (moins de 200 u3) du reste des autres malades dont les résultats sont identiques à ceux obtenus par CRONKITE : autour de 240 u3. Par contre il nous est difficile d'affirmer l'existence chez trois patients d'une double population. Si la pente de la courbe dans les grands volumes évoque cette possibilité après élimination statistique des polynucléaires (figure 7, CAR, moins de 3 % de polynulcéaires), seule la comparaison avec d'autres méthodes permettra de l'affirmer.

e) Comparaison avec d'autres méthodes

Les prélèvements fixés par la glutaraldehyde et passés au Coulter sont ensuite refixés à l'acide osmique, deshydratés et inclus pour la microscopie électronique. Sur ces blocs d'électronique, des coupes semi-fines de 1 sont pratiquées et 2 000 à 4 000 diamètres sont ensuite mesurés par le Classimat Zeiss. Les diamètres des polynucléaires sont mesurés de la même manière. Si on admet que ces cellules sont à peu près sphériques, on sait qu'il est possible de déterminer à partir des diamètres des coupes les diamètres et les volumes reels des cellules observées.[1] Ce travail est actuellement en cours, mais si il permet d'éliminer les polynucléaires, la méthode de mesure des coupes est certainement beaucoup plus longue et sans doute beaucoup moins sensible.

Signification dans la leucémie lymphoïde chronique

Cette analyse des volumes a été couplée à l'étude de l'incorporation par les mêmes cellules de la thymidine tritiée et à la mise en évidence des immunoglobulines de surface dans le département d'hématologie de l'U.E.R. Pitié-Salpétrière.

Le problème est en effet de savoir si ces volumes ont une

signification diagnostique ou pronostique.

La diminution des volumes leucocytaires n'a pas été signalée dans la leucémie lymphoïde chronique, mais on voit qu'elle n'est observée que sur trois patients sur 25. Les malades porteurs de cette anomalie ne semblent pour le moment ni plus graves, ni moins sensibles à la thérapeutique que les autres.

Surtout cette mensuration des volumes permettra d'aborder l'étude quantitative au microscope électronique des lymphocytes de la leucémie lymphoïde chronique.[1] Si on sait que la mesure d'un certain nombre de coupes prises au hasard permettra par les techniques de WEIBEL de quantifier les ultra-structures cellulaires, les valeurs obtenues sont toujours relatives, et dans tous les cas une valeur absolue doit être obtenue par d'autres méthodes.

Le travail en cours permettra de savoir si cette étude volumétrique très rapide peut remplacer l'étude des diamètres en coupes semi-fines.

CONCLUSION

Les lymphocytes du sang de 25 leucémies lymphoïdes chroniques ont été étudiées par le Coulter ZBi et Channelyser C. 1000 et le spectre des volumes lymphocytaires a été tracé.

Chez 15 malades le volume moyen et leur écart type a pu être déterminé, mais chez les autres les polynucléaires associés empêchent toute analyse statistique. La valeur de la méthode et la signification des résultats dans la maladie sont ensuite discutées.

BIBLIOGRAPHIE

1 - BINET (J.L.), DEBRE (P.) et d'ATHIS (P.) (1972) : Introduction aux techniques de stéréologie et de cytologie quantitative. Act. Hemat. Masson Ed. 1888.

2 - BRECHER (G.), JAKOBER (E.F.), SCHNEIDERMAN (M.A.), WILLIAMS (G.Z.) et SCHMIDT (P.J.) (1962) : Size distribution of erythrocytes. Ann. N. Y. Acad. Sci., 99, 242.

3 - COULTER (W.H.) (1956) : A high speed automatic blood cell counter and cell size analyser. Nat. Electron. Conf. Chicago., 3, 10.

4 - GRANT (J.L.), BRITTON (M.C.) et KURTZ (T.E.) (1960) : Measurement of red blood cell volume with the electronic cell counter. Am. J. Clin. Pathol., 33, 138.

5 - GREGG (E.C.) et STEIDLEY (K.D.) (1965) : Electrical counting and sizing of mammalian cells in suspension. Biophys. J., 5, 393.

6 - GUTTMANN (J.), HOFFMAN (G.) et RUHENSTROTH-BAUER (G.) (1965) : Exact methods for measuring the volume distribution of erythrocytes on the basis of the Coulter principle. In : Standardization in Haematology III, Stasbourg, 22-27 August.

7 - INGRAM (M.L.) (1965) : Frequency distribution histograms and MCV changs of various fractions of erythrocyte populations. In : Standardization in Haematology III. Xth Congress of European Soc. of Haematology, Strasbourg, 22-27 August.

8 - LEE (H.), RICHARDS (V.), LEEF (J.) et PERSIDSKY (M.D.) (1967) : Cells-size distribution of mouse bone marrow as determined by electronic particle countings and ocular micrometry. Am. J. Clin. Path., 47, 466.

9 - LEE (H.) et RICHARDS (V.) (1965) : Effect of X-irradiation on changes of cell distribution curve of mouse bone marrow as detected by electronic particle counting. Nature, 205, 820.

10 - LE GO (A.), PRUDHOMME (J.), FINIDORI (N.) et LE GO (R.) (1968) : Une méthode standard de numération électronique des plaquettes sanguines chez l'homme (100 sujets normaux) et les animaux de laboratoire. Rev. Franç. Etudes. Clin. et Biol., 5, 531.

11 - LE GO (A.), LE GO (R.), MALARBET (J.L.) et PRUDHOMME (J.) (1972) : Intérêt pratique du spectre érythrocytaire au cours des états de réparation post-anémiques. Etude chez le rat irradié à dose subléthale. Nouv. Rev. Franç. d'Hémat., 12, 139-158.

12 - LE GO (R.), LE GO (A.) et CROUILLERE (R.) (1970) : Le spectre des volumes cellulaires : erythrocytes; leucocytes, plaquettes. Analyse de la distribution avec un sélecteur d'amplitudes multicanaux. Nouv. Rev. Franç. d'Hémat., 10, 709-726.

13 - LUSHBAUGH (C.C.), BASMANN (H.J.) et GLASCOK (B.) (1962) : Electronic measurement of cellular volumes. II. Frequency distribution of erythrocyte volumes. Blood., 20, 241.

14 - LUSHBAUGH (C.C.), MADDY (J.A.) et BASMANN (N.J.) (1962) : Electronic measurement of cellular volumes. I. Calibration of the apparatus. Blood., 20, 233.

15 - SCHNAPPAUF (H.) et SCHNAPPAUF (U.) (1968) : Modifications de la recirculation lymphocytaire induites par stimulation antigénique, ACTH et cortisone. Nouv. Rev. Franç. d'Hémat., 8, 555-564.

16 - SIPE (C.R.), CHANANA (A.D.), CRONKITE (E.P.) JOEL (D.D.) et SCHIFFER (L.M.) (1966) : Studies on lymphopoiesis. VII. Size distribution of bovine thoracie duct lymphocytes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 123, 158.

17 - SPLANGER (G.) et CASSEN (B.) (1967) : electrophoretic mobility, size distribution and electron micrograph responses of lymphocytes to radiation. Rad. 30, 22.

18 - VAN DILLA (M.A) et HARDIN (J.M) (1966) : volume distribution of normal human erythrocytes and leucocytes. In : LA -3610- MS, 234.

19 - VAN DILLA (M.A), HARDIN (J.M) et BIDWELL (C.F) (1966) : volume distribution of mouse bone marrow cells. In : LA -3610- MS, 239

20 - ZUCKER (M.R) and CASSEN (B) (1969) : the separation of Normal human leucocytes by density and classification by size. Blood Vol. 34 n° 5, 591 - 600.

TABLE DES MATIERES

- Introduction 1

I - Materiel et méthodes 3

a) les malades 4

b) le matériel

1) Appareil

2) Préparation des lymphocytes 7

3) Fixation pour la microscopie électronique

II - Résultats 9

1 - Comparaison des spectres avant et après fixation 10

2 - Résultats sur les prélèvements de lymphocytes fixés présentant moins de 10 % de polynucléaires

III - Discussion 12

Valeur de la technique 13

a) Principe

b) Applications hématologiques

c) lymphocytes normaux 14

d) lymphocytes de la leucémie lymphoïde chronique

e) comparaison avec d'autres méthodes 15

Signification dans la leucémie lymphoïde chronique

- Conclusion 17

Bibliographie 19